

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jana Prášilová

**Cytokininy a jejich role v regulaci buněčného dělení rostlin s důrazem  
na G2/M přechod**

Cytokinines and their role in plant cell division, with accent on G2/M transition

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Hana Ševčíková

Praha 2016

### *Poděkování*

Ráda bych poděkovala především vedoucím své práce, Mgr. Haně Ševčíkové a doc. RNDr. Heleně Lipavské PhD., v neposlední řadě i RNDr. Petře Maškové PhD. za jejich odborné rady a především ochotu a vstřícnost mi pomoci při vypracování bakalářské práce. Dále mé díky patří manželovi a rodině za jejich podporu.

### *Prohlášení*

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

## **Abstrakt**

Buněčný cyklus eukaryot a jeho regulace je dobře prozkoumána především u kvasinek a živočichů. Základní mechanismy regulace buněčného cyklu rostlin jsou obdobné. Důležitou roli hrají cyklin-dependentní kinázy (CDK), které v komplexu s cykliny (CYC) řídí průběh buněčného cyklu, a to především v klíčových regulačních bodech na přechodech fází G1/S a G2/M. CDK jsou pozitivně či negativně regulovány fosforylací kinázami a defosforylací fosfatázami. Významným negativním regulátorem na přechodu G2/M je WEE1 kináza, která fosforyluje CDK na konzervovaných aminokyselinových zbytcích Y15 a T14. Tuto inhibiční fosforylaci u kvasinek a živočichů odstraňuje CDC25 fosfatáza, a následně je umožněn vstup do mitózy. Buněčný cyklus rostlin vykazuje některé odlišnosti. Funkční homolog kvasinkové CDC25 fosfatázy u vyšších rostlin nebyl nalezen, ačkoli inhibiční fosforylace rostlinnou WEE1 kinázou blokuje aktivní místo Y15 (nikoli však T14) na CDKA;1. Je tedy nasnadě hledat jinou regulační dráhu, která by řídila G2/M přechod u rostlin.

Fytohormony hrají důležitou roli nejen v buněčném cyklu rostlin, ale v celém vývoji rostliny jako celku. Klíčová je především souhra dvou hlavních skupin fytohormonů, auxinů a cytokininů. Bylo prokázáno, že především cytokininy mají zásadní vliv na regulaci přechodu G2/M u rostlin. Navržený model staví cytokininy do role aktivátoru CDC25-like či jiné rostlinné fosfatázy. Fosfatáza, po aktivaci cytokininy, defosforyluje klíčový komplex CDK-CYC, který je tak aktivován a umožní buňce vstoupit do mitózy.

Tato práce se věnuje cytokininům a jejich specifické úloze při buněčném dělení a převážně v regulaci G2/M přechodu buněčného cyklu rostlin.

**Klíčová slova:** buněčný cyklus, G2/M přechod, CDK-CYC, CDC25 fosfatáza, fytohormony, cytokininy

## **Abstract**

The eukaryotic cell cycle is well understood mainly in yeasts and animals. Basic regulatory mechanisms, with cyclin-dependent kinases (CDKs) playing crucial roles, are similar in all eukaryotes including plants. CDKs operate mainly at the key cell cycle checkpoints, G1/S and G2/M. Phosphorylation and dephosphorylation of CDKs by kinases and phosphatases have both negative and positive effect. Negative regulator at the G2/M transition is WEE1 kinase which phosphorylates conserved amino acid residues T14 and Y15 of CDK. Phosphatase CDC25 removes this inhibitory phosphate in yeasts and animals and forces cells into mitosis. Plant cell cycle exhibits remarkable differences. Importantly, it is controlled by phytohormones, and some key points of regulation remain obscure - a functional plant homologue of yeast CDC25 phosphatase has not been found in plants yet though Y15 inhibitory phosphorylation by WEE1 kinase blocks mitosis entry in plants as well. Thus, the regulatory mechanism of G2/M transition in plant cells is still to be found.

Phytohormones play a key role, not only in the plant cell cycle, but in whole plant development. Interplay between the two groups of phytohormones: auxins and cytokinins, is crucial. Especially cytokinins significantly influence the regulation of G2/M checkpoint. It is proposed that cytokinins activate CDC25-like or another plant phosphatase in order to enable transition to mitosis.

This thesis focuses on cytokinins and their specific role in the cell division, especially regulation of G2/M transition of the plant cell cycle.

**Key words:** cell cycle, G2/M transition, CDK-CYC, CDC25 phosphatase, phytohormones, cytokinins

## Seznam zkratek

AHP – Arabidopsis histidine phosphotransfer protein

AHK – Arabidopsis histidine kinase

ARR – Arabidopsis response regulator

BAP – 6-benzyl aminopurin

BC – buněčný cyklus

CAK – CDK-aktivující kináza

CDK – cyklin-dependentní kináza

CKI – CDK-inhibitorový protein

CKS – CDK-regulatory subunit

CKX – cytokininoxidáza

CYC – cyklin

cZ – *cis*-zeatin

DMAPP - dimetylalylldifosfát

iP -  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin

IPT - adenosinfosfát-isopentenyltransferáza

MSA – specifický aktivátor M fáze

PAS2 – PASSTICCINO 2

QC – quiescent center (klidové centrum)

RAM – root apical meristem (apikální meristém kořene)

SAM – shoot apical meristem (apikální meristém prýtu)

tZ – *trans*-zeatin

TZ – transition zone (přechodová zóna)

WT – wild type (divoký typ)

# Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Úvod .....   | 1  |
| 2     | Buněčný cyklus .....   | 2  |
| 2.1   | Fázové rozdělení buněčného cyklu .....                                 | 2  |
| 2.2   | Srovnávací kvasinkový model.....                                       | 3  |
| 2.3   | Specifika rostlinného BC.....  | 3  |
| 2.4   | Rostlinné cyklin-dependentní kinázy a cykliny.....                     | 3  |
| 2.4.1 | CDK.....   | 3  |
| 2.4.2 | Cykliny .....  | 4  |
| 2.5   | Kontrolní body BC .....  | 5  |
| 2.5.1 | G0 fáze a G1/S přechod buněčného cyklu.....                            | 6  |
| 2.5.2 | G2/M přechod buněčného cyklu .....                                     | 6  |
| 3     | Cytokininý .....   | 9  |
| 3.1   | Obecný úvod.....   | 9  |
| 3.1.1 | Objev .....  | 9  |
| 3.1.2 | Charakterizace a systematické členění .....                            | 9  |
| 3.1.3 | Biosyntéza a její lokalizace .....                                     | 11 |
| 3.1.4 | Degradace.....   | 12 |
| 3.1.5 | Transport .....  | 12 |
| 3.1.6 | Cytokininová signalizační kaskáda .....                                | 14 |
| 3.2   | Specifické působení cytokininů v rostlině.....                         | 15 |
| 3.2.1 | Působení cytokininů v rámci celé rostliny.....                         | 15 |
| 3.2.2 | Porovnání vlivu cytokininů na vrcholový meristém stonku a kořene ..... | 16 |
| 3.2.3 | Působení cytokininů na dělení buněk v rámci SAM .....                  | 16 |
| 3.2.4 | Působení cytokininů na dělení buněk v rámci RAM .....                  | 17 |
| 4     | Role cytokininů v regulaci buněčného cyklu rostlin .....               | 18 |
| 4.1   | Vliv cytokininů na G1/S přechod .....                                  | 18 |
| 4.2   | Vliv cytokininů na regulaci G2/M přechodu .....                        | 18 |
| 4.2.1 | Důkaz zapojení cytokininů v regulaci G2/M.....                         | 18 |
| 4.2.2 | Podstata regulace cytokininem .....                                    | 19 |
| 4.2.3 | Nahrazení účinku cytokininů Spcdc25 fosfatázou .....                   | 20 |
| 4.2.4 | Identita CDK-CYC komplexu aktivovaného rostlinnou Tyr fosfatázou ..... | 20 |
| 4.2.5 | Shrnutí cytokininové signalizace v G2/M .....                          | 22 |
| 5     | Závěr.....   | 23 |
| 6     | Seznam použité literatury .....  | 24 |

# 1 Úvod

Buněčný cyklus je esenciální proces, který zajišťuje správné replikování dědičné informace a následně i rozdělení buňky. Tento proces je přísně regulován a řízen mnohými faktory jak vnitřního, tak vnějšího prostředí buňky. Jejich interakce je zásadní pro samotný průběh i správné dokončení buněčného cyklu.

Již na střední škole mě zaujal buněčný cyklus rostlin, když jsem se v rámci studentské vědecké práce zabývala regulací buněčného cyklu u *Chlamydomonas reinhardtii*. Konkrétně jsme se v Laboratoři buněčných cyklů snažili ověřit, zdali jsou 3 potenciální proteiny homology kvasinkové Cdc25 fosfatázy, což je významný regulátor vstupu do mitózy u kvasinek i živočichů. U rostlin byla přítomnost Cdc25 fosfatázy potvrzena pouze u jednobuněčné řasy *Ostreococcus taurii* (Khadaroo et al., 2004). U vyšších rostlin zatím funkční homolog nebyl objeven. Některé hypotézy tvrdí, že funkci Cdc25 fosfatázy u rostlin nahradila jiná regulační dráha. O těchto úvahách se také ve své práci zmíním, ale hlavně se zaměřím na regulaci vstupu do mitózy fytohormonem cytokininem.

Z hlediska rostlinného buněčného cyklu hrají významnou roli fytohormony. Různé druhy fytohormonů ovlivňují nejen buněčný cyklus, ale i rostlinu jako celek, poněvadž se zapojují do všech růstových i vývojových procesů odehrávajících se v rostlině. Z významných fytohormonů zmíním především auxiny a cytokininy, jejichž interakce a přesná regulace je nezbytná pro správný růst a vývoj rostliny. Bylo zjištěno, že cytokininy jsou významně zapojeny v regulaci buněčného cyklu, a to především v klíčových fázích, kdy buňka začíná replikovat dědičnou informaci a zahajuje dělení. V této práci se pokusím shrnout doposud zjištěné poznatky o funkci cytokininů při buněčném dělení, a především v regulaci vstupu buňky do mitózy. Regulace buněčného cyklu při zahájení replikace dědičné informace a zapojení cytokininů v této regulační kaskádě bylo již dobře prozkoumáno. Naopak celá regulační dráha vstupu buňky do mitózy nebyla u rostlin doposud plně rozklíčována, proto jsem se chtěla zaměřit právě na tuto fázi, a především popsat specifickou roli cytokininů.

## 2 Buněčný cyklus

Komplexní, přesně řízený i hluboce konzervovaný v rámci evolučního vývoje, a přesto stále se vyvíjející proces studovaný mnohými vědci světa. Tak by se dal několika slovy popsat buněčný cyklus (BC). Je to soubor koordinovaných procesů mezi jednotlivými děleními buňky, který zároveň zajišťuje správný vývoj buňky vedoucí k jejímu přesně načasovanému rozdělení. Regulace buněčného cyklu z hlediska přesného načasování, lokalizace i bezchybnosti je nezbytná pro správnou funkci meristémů, organogenezi i růst organismů.

### 2.1 Fázové rozdělení buněčného cyklu

Modelový buněčný cyklus zahrnuje čtyři fáze, které jsou shodné u všech eukaryotických organismů; G1, S, G2, M. Nejprve se musí buňka připravit na dělení, což znamená zvětšit svůj objem a syntetizovat všechny stavební kameny nukleových kyselin a replikačního aparátu. Tyto procesy zahrnuje G1 fáze (z anglického gap – mezer). Pokud nenastanou žádné komplikace, buňka přechází do S fáze, ve které replikuje DNA. Buňka, která není připravena zahájit replikaci DNA, může vstoupit do G0 fáze, kde dále roste, nebo prochází různými modifikacemi. G2 fáze odděluje S fázi od fáze, kdy probíhá mitóza (M). V přípravné G2 fázi buňka nadále syntetizuje proteiny, množí organely a zvětšuje svůj objem až do kritického bodu, kdy je jí umožněno zahájit mitózu. Celý buněčný cyklus můžeme rozdělit také jen do dvou hlavních fází: interfáze (přípravná fáze, období mezi dvěma následnými mitózami, je to souhrn fází G1, S a G2 fáze) a buněčné dělení. Buněčné dělení se skládá ze dvou procesů: dělení jádra (karyokineze) a dělení buňky (cytokineze). Karyokineze může probíhat dvěma způsoby: mitózou a meiózou. Mitóza je častější způsob, kterým se dělí jádra somatických buněk. Meiózou vznikají jádra gamet. Shrnutí například v: Harashima et al., 2013. Buněčný cyklus je konzervovaný napříč všemi eukaryotickými organismy (Nurse, 1990). Důležitým proteinem s univerzální rolí v buněčném cyklu je cyklin-dependentní protein kináza cdc2, která byla poprvé objevena u kvasinek *Schizosaccharomyces pombe* (Nurse and Bissett, 1981). Následně byly objeveny i její homology u dalších organismů včetně rostlin (John et al., 1989). Produkty genů homologních k *cdc2* se nazývají cyklin-dependentní kinázy (CDK) a v komplexu s cykliny (CYC) ovlivňují jak G1/S tak G2/M přechod (Morgan, 1997; Nurse, 2002).



## 2.2 Srovnávací kvasinkový model

V roce 1971 Murdoch Mitchison zavedl experimentální model pro studium eukaryotického buněčného cyklu, poltivou kvasinku (fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*) (Mitchison, 1971). Následně Leland Hartwell použil kvasinku pučivou (budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*) (Hartwell, 1974) ke stejnému účelu a oba organismy se staly důležitými modely, nejen ke studiu buněčného cyklu. Regulace kvasinkového buněčného cyklu poslouží i v této práci jako model k porovnání a vytyčení klíčových míst regulace rostlinného BC. Buněčný cyklus *S. pombe* je regulován na obou přechodech, G1/S i G2/M, CDK kódovanou *cdc2* genem (Nurse and Bissett, 1981). U *S. cerevisiae* je průchod buněčným cyklem řízen především na úrovni G1/S přechodu, a to konkrétně cyklin-dependentní kinázou kódovanou *CDC28* genem, což je ortolog *cdc2* (Hartwell, 1974).

## 2.3 Specifika rostlinného BC

Rostlinný vývoj má oproti živočišnému několik jedinečných vlastností. Z velké části je post-embryonální. Neukončený růst zajišťuje produkci nových orgánů periodicky se opakujícím dělením, následovaným buněčným růstem a diferenciací. Buněčné dělení, jehož důsledkem je tvorba rostlinných orgánů, probíhá v rámci meristémů (dělivá pletiva). Listy a květy jsou vytvořeny apikálním meristémem prýtu (SHOOT APICAL MERISTEM, SAM). SAM původně produkuje listy, ale za správných podmínek je konvertován na květní meristém produkující květy. Hlavní kořen je vytvářen apikálním meristémem kořene (ROOT APICAL MERISTEM), který stále produkuje nové buňky rostoucímu kořeni. Rostliny jsou také velmi flexibilní, poněvadž mnoho diferencovaných rostlinných buněk má schopnost se dediferencovat i rediferencovat. Navíc rigidní buněčná stěna rostlinných buněk znemožňuje jejich migraci, což zjednodušuje organizaci rostlinných pletiv. Tyto výhodné vlastnosti umožňují rostlině přežít i přes její přisedlý způsob života, který ji v mnohých jiných ohledech znevýhodňuje.

## 2.4 Rostlinné cyklin-dependentní kinázy a cykliny

### 2.4.1 CDK

Rostlinné cyklin-dependentní kinázy patří mezi serin-treonin proteinkinázy, poněvadž po vazbě cyklinové podjednotky fosforylují substráty na serinových a treoninových aminokyselinových zbytcích (Doonan and Kitsios, 2009). CDK se exprimují v buňkách s dělivým potenciálem. Řadíme je do sedmi tříd: A-G. A, B, D a F třídy jsou spojeny s regulací buněčného cyklu. Třídy C, E a G mají úlohu v rostlinném vývoji, ale ne přímo v regulaci BC, proto se jimi podrobněji zabývat nebudu (Van Leene et al., 2011). Všechny

studované organismy obsahují alespoň jednu CDK s PSTAIRE motivem v cyklin-vazebné doméně (Joubes et al., 2000). U rostlin byl tento klíčový motiv nalezen u CDKA a umožňuje CDKA funkčně komplementovat CDK-deficientní kvasinky (Hirayama et al., 1991). *Arabidopsis thaliana* (dále jen *Arabidopsis*) kóduje CDKA pouze jedním genem, *CDKA;1* (Iwakawa et al., 2006). Kontrola duplikace DNA a vstup do mitózy, tedy oba přechody: G1/S i G2/M, jsou závislé na správné expresi *CDKA;1* (Nowack et al., 2012; Porceddu et al., 2001). Vazba *CDKA;1* ke konkrétnímu cyklinu směřuje její kinázovou aktivitu k dané fázi buněčného cyklu.

Třída CDKB kináz nebyla popsána u jiných organismů než u rostlin, a je proto pro rostlinnou říši unikátní (Joubes et al., 2000). Cyklin-vazebný motiv PPTA(T)LRE neumožňuje CDKB komplementovat *cdc2/cdc28* kvasinkové mutanty, ačkoli u některých nižších rostlin je tato komplementace možná (Corellou et al., 2005). CDKB dělíme do dvou podtříd podle motivu v cyklin-vazebné doméně. Podtřída CDKB1, obsahující PPTALRE motiv, zahrnuje CDKB1;1 a CDKB1;2 kinázy a podtřída CDKB2 s PPTTLRE motivem CDKB2;1 a CDKB2;2 kinázy (Vandepoele et al., 2002). *CDKB* se exprimují v S, G2 a M fázích (B1 typ) nebo v G2 a M fázích (B2 typ) (Menges et al., 2005).

Jak již bylo zmíněno, aktivita CDK je regulována fosforylací, konkrétně fosforylací konzervovaného treoninového zbytku (Thr160 či ekvivalentní), která vede ke konformační změně a rozpoznání substrátu. Fosforylaci provádí CDK-aktivující kinázy (CAK) (Umeda et al., 1998), které jsou známy jako CDKD a CDKF kinázy (Umeda et al., 2005; Vandepoele et al., 2002). CAK jsou důležité pro určení růstové rychlosti tím, že určují celkovou úroveň aktivity CDK.

#### **2.4.2 Cykliny**

Cykliny rostlin se exprimují v aktivně se dělících pletivech a mají krátký poločas rozpadu (schopnost rychlé degradace a opětovné exprese). Jsou zodpovědné za změnu konformace katalytického místa CDK (tím pádem aktivaci CDK), výběr substrátu, lokalizaci v rámci buňky i stabilitu komplexů CDK-cyklin. Cykliny obsahují tzv. cyklin box se sekvencí o cca 100 aminokyselinách, umožňující navázání na CDK (Lees and Harlow, 1993) a také destrukční box, citlivý na ubikvitinaci vedoucí k proteolýze (Glotzer et al., 1991). Klasifikace rostlinných cyklínů se odvíjí od funkční podobnosti se savčími třídami cyklínů. Největší podobnost vykazují rostlinné cykliny se třídami A, B a v menší míře i D cyklínů savců (Renaudin et al., 1996). A i B cykliny jsou rozděleny do tří podtříd, CYCA1-CYCA3 a CYCB1-CYCB3 (Menges et al., 2005). Klasifikujeme je jako mitotické cykliny, i když ne

všechny ovlivňují mitózu. Například komplexy CDKA;1-CYCA3 řídí průchod S fází (Van Leene et al., 2010). Třída A vykazuje maximální míru exprese ve fázích S, G2 a M a třída B v G2 a M fázích. Cyklin-dependentní kinázy B skupiny se preferenčně váží na CYCA2 a CYCB (Boudolf et al., 2009; Schnittger et al., 2002). Postupná aktivace komplexů CDKB-CYCA2 a CDKB-CYCB je vyžadována pro vstup rostlinné buňky do mitózy (Vanneste et al., 2011). Geny exprimované specificky v G2 a M fázích obsahují v promotorech specifický aktivátor M fáze (M phase-specific activator, MSA). Promotor s MSA obsahuje jak cykliny A, tak B třídy (Ito et al., 2001). Třetí důležitou třídou jsou D cykliny, které se dělí do sedmi podtříd, CYCD1-CYCD7. Cykliny D typu se váží pouze na CDKA;1 (Vandepoele et al., 2002), s výjimkou CYCD4;1, který se váže také na CDKB2;1 (Kono et al., 2003). Ovlivňují převážně G1/S přechod (Riou-Khamlichi et al., 1999), ale například CYCD3;1 v komplexu s CDKA;1 řídí jak přechod G1/S, tak vstup do M fáze a její délku (Dewitte et al., 2007; Menges et al., 2005).

## 2.5 Kontrolní body BC

Již na počátku 80. let 20. stol. Van't Hof *et al.* určili přechody G1/S a G2/M jako základní kontrolní body buněčného cyklu rostlin (Van't Hof, 1973). Později bylo zjištěno, že základem kontroly těchto klíčových bodů je fosforegulace proteinů, kdy hlavní roli hrají cyklin-dependentní kinázy (CDK). Jejich katalytická aktivita je však závislá na cyklinech (CYC) (Evans et al., 1983), partnerech, které vlastní katalytickou aktivitu nevykazují, bez nichž však CDK nemohou fungovat (Lees and Harlow, 1993). Katalytická podjednotka CDK je zodpovědná za rozpoznání cílového motivu (Ser/Thr-Pro) na substrátu, zatímco cyklinová podjednotka je variabilní a určuje, na který substrát se CDK naváže (Ubersax et al., 2003). Již vytvoření konkrétního komplexu CDK-CYC reguluje určitý kontrolní bod, navíc ještě regulace aktivity těchto komplexů umožňuje místně i časově rozdělit události buněčného cyklu. U rostlin je tato regulace zajištěna následujícími 4 mechanismy: I) Fosforylace či defosforylace aminokyselinových zbytků CDK, například T14 a Y15 při regulaci přechodu G2/M. II) Interakce s CDK aktivujícími kinázami (CAK). Fosforylace prováděná CAK na treoninu 160 (T160), či jiném ekvivalentním aminokyselinovém zbytku, umožní CDK změnit konformaci a rozpoznat konkrétní substrát (Umeda et al., 1998). III) Vazba regulačních proteinů, jako jsou CDK regulační podjednotky (CKS) (De Veylder et al., 1997) a CDK inhibitorové proteiny (CKI). Rostlinné CKI obsahují členy 2 rodin: KIP-RELATED PROTEIN/INTERACTOR OF CDKs (KRP/ICK) (De Veylder et al., 2001) a

SIAMESE/SIAMESE-RELATED (SIM/SMR) (Churchman et al., 2006). IV) Cílená proteolýza.

#### **2.5.1 G0 fáze a G1/S přechod buněčného cyklu**

Buňka opouští buněčný cyklus a vstupuje do G0 fáze, pokud není schopna, či nepotřebuje zahájit dělení. Typicky jsou to buňky, které se diferencují. Některé buňky jsou ale schopny vystoupit z G0 a začít znovu buněčný cyklus. Při tomto přechodu a zároveň i vstupu buňky do S fáze hrají důležitou roli retinoblastoma proteiny (Rb) (Grafi et al., 1996), které negativně regulují transkripční faktory E2F. Uvolnění E2F z inhibičního vlivu je podmínkou, pro vstup buňky do S fáze (Ramirez-Parra et al., 1999). Při přechodu z G0 do G1 fáze CAK fosforyluje CDKA;1 na T160/167 (Yamaguchi et al., 1998), a umožní tak navázání cyklinů typu D na CDKA;1. Vazba cyklinů typu D na CDKA;1 aktivuje komplexy CDKA;1-CYCD a může dojít k fosforylaci Rb proteinů (Bonioti and Gutierrez, 2001). Následně se uvolní E2F faktory, které indukují expresi specifických genů S fáze, a buňka zahajuje replikaci (Uemukai et al., 2005).

#### **2.5.2 G2/M přechod buněčného cyklu**

Na konci G2 fáze buněčného cyklu se utváří G2/M regulující komplexy CDK-CYC. Mitotické cykliny A a B třídy se váží na CDK třídy B, nikoli A. S CDKA;1 v této fázi tvoří komplex převážně CYCD3;1 (Van Leene et al., 2010). G2/M přechod tedy ovlivňují komplexy CDKB1-CYCA2/B3, CDKB2-CYCB1 a CDKA-CYCD3;1 (Menges et al., 2005; Sorrell et al., 2001; Van Leene et al., 2011; Van Leene et al., 2010). Pokud je rostlina vystavena stresu a/nebo replikace DNA není kompletní, tak nastupuje negativní regulátor vstupu do mitózy kináza WEE1 (De Schutter et al., 2007; Russell and Nurse, 1987). U *S. pombe* má WEE1 definovanou funkci, fosforyluje Cdc2 na T14 a Y15 na ATP-vazebném místě, a tím tuto kinázu inaktivuje (Denhaese et al., 1995; Russell and Nurse, 1987). Funkce rostlinné WEE1 kinázy není ještě stále zcela popsána. Overexprese homologů *WEE1* Arabidopsis a kukuřice (*Zea mays*) v kvasinkových buňkách (*S. pombe*) působí zablokování buněčného cyklu, buňky nadále rostou, ale nemohou se rozdělit (Sorrell et al., 2002; Sun et al., 1999). Blokace vstupu do mitózy naznačuje, že by WEE1 u rostlin mohla mít stejnou funkci jako u kvasinek. Bylo zjištěno, že *in vitro* Arath;WEE1 fosforyluje CDKA;1 na tyrozinu 15 (Shimotohno et al., 2006). Tuto funkci rostlinné WEE1 kinázy potvrdily i další experimenty využívající *Solly;WEE1* (izolované z rajčete, *Solanum lycopersicum*). U buněk se sníženou expresí *Solly;WEE1* došlo k nárůstu kinázové aktivity CDKA;1 a buňky byly kratší, což bylo důsledkem sníženého množství fosforylovaného Y15 na CDKA;1 a

předčasného vstupu do mitózy (Gonzalez et al., 2007). Schopnost rostlinné WEE1 fosforylovat i T14 zatím nebyla potvrzena. Je možné, že fosforylační místo T14 u rostlin nehraje tak významnou roli, jako u kvasinek a živočichů. Rostlinný homolog WEE1 kinázy T14 pravděpodobně nefosforyluje a zároveň není potvrzeno, že by Arath;CDC25 interagovala s tímto místem (Landrieu et al., 2004). Vzhledem k tomu, že důležitost defosforylace T14 u rostlin nebyla zatím potvrzena, nebudu toto fosforylační místo dále ve své práci zmiňovat. Zároveň nebylo prokázáno, že je rostlinná WEE1 kináza schopná fosforylovat CDKB.

V současnosti je tedy představa regulace G2/M přechodu pomocí WEE1 kinázy založena na fosforylaci Y15 CDKA;1. Dále CDK-aktivující kináza (pravděpodobně CDKD v komplexu s CYC) fosforyluje CDKA/B na Thr160 (Umeda et al., 2005) a následně je umožněna tvorba komplexů CDK-CYC. Před vstupem do M fáze je zásadní odstranit inhibiční fosforylace z Y15, aby byla uvolněna vazebná místa pro substrát a ATP. V tomto okamžiku se zapojuje cytokinin, který pravděpodobně aktivuje CDC25-like fosfatázu (viz dále). Je navržen model, kdy tato fosfatáza defosforyluje aminokyselinový zbytek Y15 na CDKA/B, čímž kinázy aktivuje (Zhang et al., 2005). Aktivní CDKA/B spustí fosforylace mnoha substrátů, v důsledku tak umožní buňkám zahájit dělení.

#### **2.5.2.1 Problematika nalezení rostlinného homologu CDC25 fosfatázy**

U živočichů a kvasinky *S. pombe* jsou inhibiční fosfáty na T14 a Y15 odstraněny duálně specifickou protein Tyr fosfatázou<sup>1</sup> CDC25 (Kumagai and Dunphy, 1991). Nicméně její funkční homolog nebyl u vyšších rostlin nalezen. Plně funkční CDC25 komplementující *cdc25<sup>-</sup>* kvasinkového mutantu byla nalezena pouze u jednobuněčné řasy *Ostreococcus tauri* (Khadaroo et al., 2004). U *Arabidopsis* byla objevena malá CDC25 fosfatáza, která ale postrádá regulační doménu. Dokáže defosforylovat CDK *in vitro* (Landrieu et al., 2004) a při zvýšené expresi v *S. pombe* způsobí zvýšený počet kratších buněk, čímž potvrzuje funkci mitotického aktivátoru (Sorrell et al., 2005). Nicméně nedokáže komplementovat kvasinkového *cdc25-22* mutantu<sup>2</sup> (Landrieu et al., 2004), zřejmě protože postrádá esenciální regulační doménu a je exprimována v nízkých množstvích v celé rostlině (Sorrell et al., 2005). Je nutné také zvážit možnost, že jako hlavní fosfatáza defosforylující tyrozin na CDK

---

<sup>1</sup> Protein Tyr fosfatázy (duálně specifické) – rodina fosfatáz, které jsou především Tyr specifické, tzn. defosforylují tyrozinový zbytek na daném substrátu, nebo mohou působit i na dvou konkrétních místech, pak jsou duálně specifické (jako CDC25 fosfatáza, která je schopna defosforylovat T14 a Y15).

<sup>2</sup> Kvasinkový *cdc25-22* mutant – kvasinkové buňky s touto teplotně senzitivní mutací se při restriktivní teplotě zablokuje v G2 fázi buněčného cyklu a nejsou schopny zahájit mitózu.

nefiguruje u vyšších rostlin CDC25, ale jiná nepříbuzná Tyr fosfatáza. Dokonce Da Costa *et al.* (2006) naznačují, že by buněčný cyklus u rostlin nemusel být řízen jen kinázou a fosfatázou, ale i antifosfatázou. Jako antifosfatázu označují protein PASTICCINO2 (PAS2), kódovaný genem *PAS2*, který je členem rodiny proteinů Tyr phosphatase-like. PAS2 interaguje s fosforylovanou CDKA;1, chrání fosforylované Y15 zbytky před defosforylací fosfatázou, a tím ovlivňuje fosforylační stav CDKA;1 i jeho kinázovou aktivitu. Pokud není navázaný PAS2, CDKA;1 je defosforylována zatím neznámou Tyr-fosfatázou a je umožněn přechod buňky do M fáze. Předpokládají, že PAS2 kompetuje s aktivační Tyr fosfatázou o fosforylovaný substrát (CDKA;1), a tak se významně podílí na řízení G2/M přechodu buněčného cyklu (Da Costa et al., 2006). Boudolf *et al.* (2006) navrhuji další alternativu, která by nahradila CDC25 fosfatázu u rostlin. Kináza CDKB1;1 podle nich vykazuje mnohé podobné vlastnosti jako CDC25 fosfatáza. Exprese genů *CDKB1;1* a *CDC25* mají podobné rozložení s vrcholem na G2/M přechodu buněčného cyklu. Jsou výhradně exprimovány v mitoticky se dělících pletivech u rostlin, a v tkáních u *Drosophily*, také inhibují přechod mezi mitózou a endoreduplikací<sup>3</sup>. Mechanismus G2/M přechodu řízený CDKB1;1 by nezávisel na defosforylaci CDK prostřednictvím CDC25 fosfatázy, ale na specifické aktivaci CDKB1;1. Jako důvod autoři uvádí evoluční ztrátu *CDC25* genu rostlinnou říší, před oddělením větve zelených a červených řas a jeho funkční nahrazení *CDKB1;1*. Nicméně ani tato teorie zatím není podložena průkaznými výsledky (Boudolf et al., 2006).

---

<sup>3</sup> Endoreduplikace - u některých buněk je replikace jaderné DNA následována další replikací, aniž by došlo k mitóze a cytokinezi. Tento proces se nazývá endoreduplikace a vede k tvorbě buněk s větší velikostí a několikanásobným množstvím jaderné DNA.

## 3 Cytokininy

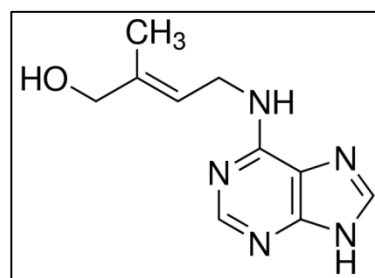
### 3.1 Obecný úvod

#### 3.1.1 Objev

Cytokininy, látky nezbytné pro správný rostlinný vývoj, objevili vědci Skoog, Miller *et al.* v roce 1955, když testovali látky schopné iniciovat a podporovat proliferaci buněk tabáku. Pozorovali, že hledané účinky nejlépe vykazuje poškozená či stará spermatická DNA sledě, z níž izolovali a popsali první cytokinin kinetin. Kinetin je derivát adeninu, konkrétně 6-furfurylaminopurin. Jméno získal podle své schopnosti vyvolat buněčné dělení tabákových buněk, ovšem za současné přítomnosti auxinu (Miller *et al.*, 1955a; Miller *et al.*, 1955b). Dlouho byl považován za syntetickou látku, která se přirozeně v organismech nevyskytuje. Až v roce 1996 byl detekován v DNA lidských i rostlinných buněk (Barciszewski *et al.*, 1996), od té doby je klasifikován jako přirozeně se vyskytující látka. Stejný biologický efekt vykazoval i extrakt z nezralého endospermu kukuřice. Jako funkční molekula v tomto extraktu byl určen *trans*-zeatin a byl prohlášen prvním přirozeným cytokininem (Letham, 1963).

#### 3.1.2 Charakterizace a systematické členění

Od 50. let, kdy byly cytokininy objeveny, vědci postupně odhalovali, že tyto rostlinné růstové regulátory působí na mnohých úrovních růstu a vývoje rostlin. Ovlivňují převážně buněčné dělení, iniciaci i samotný růst prýtu, senescenci listů<sup>4</sup>, apikální dominanci<sup>5</sup>, transport látek rostlinou, příjem živin, fylotaxi<sup>6</sup> a vývoj cév, gametofytu<sup>7</sup> i fotomorfogenezi<sup>8</sup> (Přehledně shrnuto v: (Hwang *et al.*, 2012)). Do skupiny



Obr. 1 - Vzorec *trans*-zeatinu

cytokininů dnes řadíme mnoho látek jak přirozeného, tak syntetického původu. Dělíme je na adeninové a phenylureové deriváty. Přirozeně se vyskytující cytokininy chemickou strukturou odpovídají adeninovým derivátům a podmínkou jejich biologické aktivity je substituce na aminoskupině v poloze 6. Zahrnují isoprenoidní a aromatické cytokininy. V rostlinách se cytokininy vyskytují nejčastěji ve volné formě, která je nejvíce biologicky aktivní, dále jako

<sup>4</sup> senescence listů – poslední fáze vývoje listu, která vede k programované buněčné smrti a končí opadem listu

<sup>5</sup> apikální dominace – vztah mezi vegetativním vrcholem a postranními pupeny, kdy vrchol stonku má nadvládu nad postranními pupeny, nebo má inhibiční vliv na prorůstání postranních pupenů

<sup>6</sup> fylotaxe – postavení listů na stonku rostlin

<sup>7</sup> gametofyt – pohlavní (haploidní) stadium rostlin, které prochází životním cyklem zvaný rodozměna (střídání pohlavní a nepohlavní generace)

<sup>8</sup> fotomorfogeneze – regulace růstu a vývoje rostlin světlem

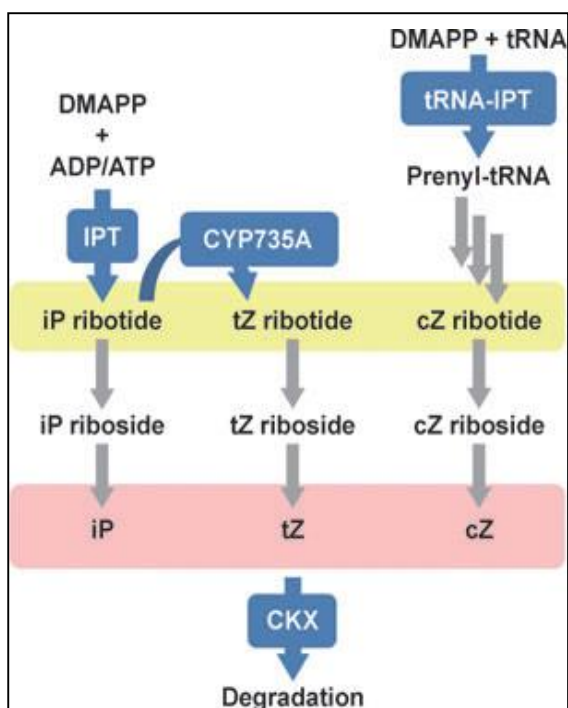
odpovídající nukleotidy a nukleosidy, ale taktéž vázané ve formě tRNA. Nejvíce rozšířené jsou isoprenoidní cytokininy s *trans*-hydroxylovaným N6 postranním řetězcem, jako je *trans*-zeatin (tZ) a jeho deriváty (např. dihydrozeatin) či  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP) a jeho deriváty (Letham, 1963; Mok and Mok, 2001). Struktura a konformace postranních řetězců jsou klíčové pro aktivitu cytokininů. Jeden z nejvíce se vyskytujících cytokininů, *trans*-zeatin, je velmi biologicky aktivní, zatímco jeho izomer *cis*-zeatin (cZ) mnohem méně (Schmitz et al., 1972). *Trans*-zeatin je biologicky aktivní u všech rostlin, *cis*-zeatin pouze u některých druhů (Emery et al., 1998). Modifikací adeninového kruhu, po navázání ribózy na N9 vznikají ribozidy, ty mají sníženou aktivitu oproti volným cytokininům. Nejnižší biologickou aktivitu mají ribotidy s navázanou kyselinou fosforečnou v poloze 5. Nicméně tvorba ribozidů a ribotidů má velký význam pro regulaci hladiny volných aktivních cytokininů a pro jejich transport (Kudo et al., 2010; Takei et al., 2004a). Mezi aromatické cytokininy zařazujeme 6-benzylaminopurin (BAP) a jeho deriváty (obecně topoliny) (Strnad, 1997) či kinetin. Phenylureové deriváty zahrnují pouze syntetické cytokininy a jako příklad lze uvést diphenylureu či thidiazuron (Mok et al., 1987).



### 3.1.3 Biosyntéza a její lokalizace

Biosyntéza přirozených isoprenoidních cytokininů může probíhat několika cestami: přímou, nepřímou či alternativní cestou, o které se nebudu v této práci zmiňovat (podrobnosti lze najít v článku: Astot et al., 2000).

Přímá syntéza u rostlin začíná adicí isopentenylové skupiny dimetylallyldifosfátu (DMAPP) na adeninovou skupinu, buď ATP či ADP (Kakimoto, 2001). Přenos katalyzuje rostlinný enzym adenosinfosfát-isopentenyltransferáza (IPT). Enzym IPT nebyl u rostlin dlouho objeven, až na základě genomových analýz bylo u *Arabidopsis thaliana* identifikováno 9 genů, *AtIPT1* až *AtIPT9*, jejichž produkty měly předpokládanou IPT aktivitu (Takei et al., 2001a). IPT byly následně rozděleny do dvou rodin: ATP/ADP isopentenyltransferázy (u *Arabidopsis* *AtIPT1*, 3, 4-8), které tvoří isopentenyladeninové a *trans*-zeatinové cytokininy a rodina tRNA IPT (u *Arabidopsis*, *AtIPT2* a 9), produkující cytokininy *cis*-zeatinového typu, pravděpodobně modifikací tRNA (Golovko et al., 2002; Kakimoto, 2001; Miyawaki et al., 2006; Takei et al., 2001a). Produktem reakce DMAPP s ATP/ADP je isopentenyl-adenosin-5'-trifosfát (iPTP) a isopentenyl-adenosin-5'-difosfát (iPDP). Látky iPDP/iPTP jsou následně konvertovány na *trans*-zeatin hydroxylázami CYP735A1 a CYP735A2 (Takei et al., 2004b). Následná modifikace iPTP/iPDP a *tZ* nukleotidů vede k tvorbě volných bází, které jsou nejvíce biologicky aktivní. Nepřímá cesta syntézy cytokininů začíná degradací tRNA, ta vede k uvolnění *cis*-zeatinu, který



Obr. 2 – Schéma biosyntézy a degradace cytokininů. První dva sloupce znázorňují přímou syntézu cytokininů. Adici DMAPP na adeninovou skupinu ADP/ATP katalyzuje enzym IPT. Vznikající iP ribotidy mohou být dále konvertovány hydroxylázami CYP735A na tZ ribotidy a následně na tZ ribozidy i samotný *trans*-zeatin. Z iP ribotidů vznikají iP ribozidy, posléze iP cytokininy. Třetí sloupec zobrazuje nepřímou syntézu cytokininů, které se místo ATP/ADP účastní tRNA. DMAPP se váže na tRNA za katalýzy enzymem tRNA-IPT. Vzniklé *cis*-zeatinové ribotidy a ribozidy se přeměňují na konečný produkt *cis*-zeatin. Cytokiny jsou degradovány cytokinin oxidázami/dehydrogenázami (CKX). Převzato a upraveno z: Kudo et al., 2010.

dokáže konvertovat na *trans*-zeatin, přeměnou katalyzovanou enzymem *cis-trans*-izomerázou (Bassil et al., 1993). Avšak rozpad tRNA probíhá v celé rostlině, zatímco produkce cytokininů je lokalizována do několika míst a je přísně regulována. Výzkumy následně ukázaly, že cZ se na tZ téměř nepřeměňuje, poněvadž aktivita *cis-trans*-izomerázy je nízká. Tudíž hlavním zdrojem *trans*-zeatinových cytokininů zůstává přímá syntéza a nepřímá slouží převážně pro výrobu *cis*-zeatinového typu cytokininů (Miyawaki et al., 2006).

Specifické expresní vzorce jednotlivých členů *ATP/ADP IPT* genové rodiny určují lokalizaci syntézy volných cytokininů. Hladina exprese *AtIPT3*, *5*, *7* je vysoká ve vegetativních orgánech. Výhradně v reprodukčních orgánech je exprimován *AtIPT8*, konkrétně v nezralých semenech, stejně jako *AtIPT4*. *AtIPT1* je exprimován ve vaječných buňkách a vegetativních orgánech (Miyawaki et al., 2004). Pomocí proteinových modifikací AtIPT je regulována lokalizace syntézy cytokininů. Konkrétně farnesylace AtIPT3 mění lokalizaci proteinu z plastidu do jádra či cytoplasmy (Galichet et al., 2008). Hladina cytokininů v rostlině je řízena mnoha faktory. *De novo* biosyntézou, konverzí mezi volnými bázemi, nukleosidy a nukleotidy, inaktivací, degradací a translokací cytokininů.

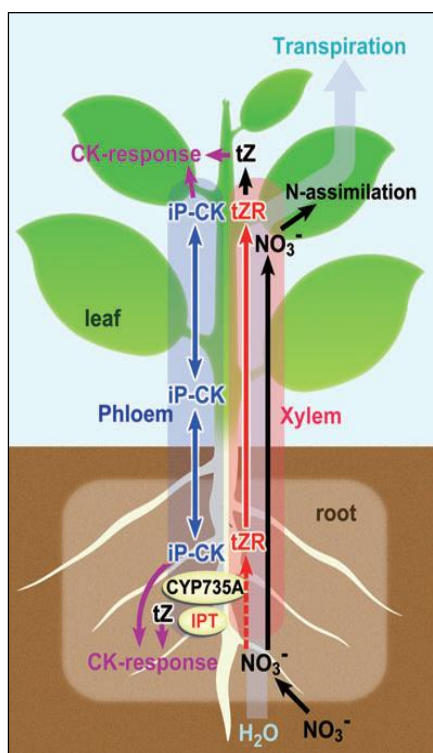
#### **3.1.4 Degradace**

Degradace volných cytokininovýchází a nukleosidů s nenasycenými N<sup>6</sup> postranními řetězci je katalyzována cytokininoxidázami/dehydrogenázami (CKX) (Morris et al., 1999). V roce 2001 se podařilo Wernerovi *et al.* připravit transgenní rostlinu *Nicotiana tabacum* exprimující 4 homology cytokininoxidázy *Arabidopsis*. Transgenní linie vykazovaly zvýšenou aktivitu cytokininoxidázy, v rostlinách tak byly významně sníženy hladiny isopentenylových a zeatinových cytokininů. Poprvé mohly být provedeny experimenty sledující fenotypické projevy snížených endogenních hladin cytokininů (Werner et al., 2001).

#### **3.1.5 Transport**

Původně se předpokládalo, že transport cytokininů probíhá pouze společně s vodou a živinami vzestupně od kořenů k nadzemní části rostliny prostřednictvím xylému. Nicméně později bylo zjištěno, že transport probíhá *de facto* celou rostlinou (Hirose et al., 2008). Mechanismus přenosu cytokininů přes plasmatickou membránu rostlinných buněk není ještě zcela objasněn, nicméně u *Arabidopsis* byly objeveny dvě rodiny nízkoafinitních transportérů. Purinové permeázy (PUP) transportují cytokininové báze symportem s protony (Gillissen et al., 2000) a rodina ENT (equilibrative nukleoside transporter) přenáší cytokininové nukleosidy usnadněnou difúzí (Hirose et al., 2005; Hirose et al., 2008). Bylo zjištěno, že transport na delší vzdálenost probíhá xylémem ve formě tZ-ribosidů a floémem primárně iP-typem

cytokininů. Následně vědci vyvodili, že rostliny pravděpodobně využívají tZ-ribozidy k signalizaci v transportu směrem od kořene k prýtu. Cytokininů iP-typu mají roli systémových signálů, které přenáší informace z kořene směrem k prýtu a z listů směrem ke kořeni (Kudo et al., 2010). Cytokininů nelze klasifikovat jako hormony působící pouze na krátkou či dlouhou vzdálenost. Na jednu stranu exprese genů pro biosyntézu, degradaci a cytokininovou signalizaci probíhá na různých místech, což by napovídalo, že cytokininů budou mít lokální funkci. Na druhou stranu transport cytokininů od kořene k prýtu xylémem a od prýtu ke kořeni floémem nahrává spíše hypotéze, že slouží jako signální molekuly, působící na delší vzdálenosti. Takže můžeme říci, že cytokininů působí jak na dlouhou, tak krátkou vzdálenost. Zajímavé je, že akumulace cytokininů také závisí na množství dusíku, který rostlina přijímá a

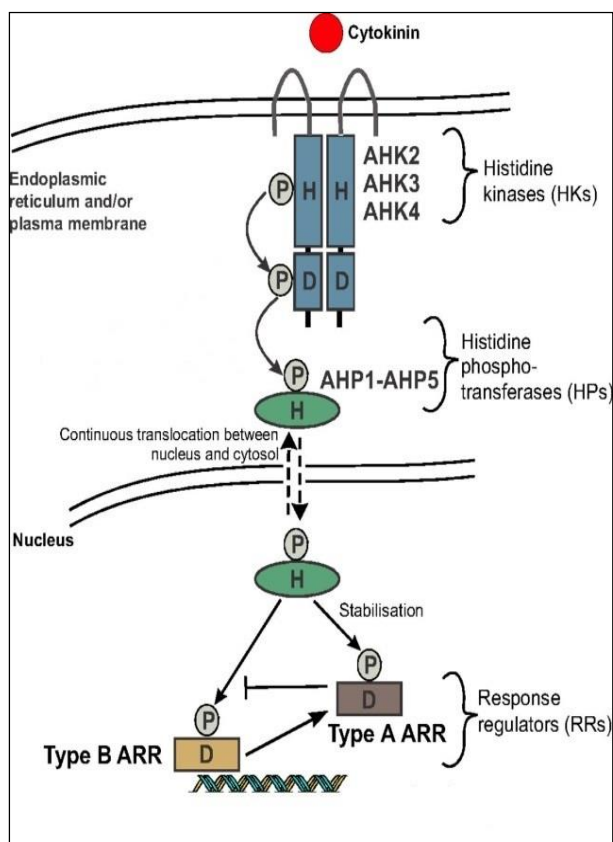


Obr. 3 – **Model transportu cytokininů na delší vzdálenost.** Xylémem jsou transportovány *trans*-zeatinové cytokininů (tZR, červené šipky) a floémem cytokininů iP typu (iP-CK, modré šipky). Dusičnany indukují expresi IPT a následně biosyntézu (katalyzovanou hydroxylázami CYP735A) a translokaci tZR. Transport tZR probíhá xylémem směrem vzhůru transpiračním proudem, stejně jako přenos dusičnanů (černé šipky), které se v listech asimilují do aminokyselin. Floémové cytokininů (iP) jsou přenášeny od prýtu ke kořeni, nebo působí jako systémové signály. Míst působení cytokininových signálů je mnoho po celé rostlině (fialové šipky). Převzato a upraveno z: Kudo et al., 2010

jeho koncentraci v půdě. Když Takei *et al.* (2001) dodali dusičnany kukuřici hladovějící na dusík, hromadil se v této rostlině cytokinin postupně v kořenech, xylému a nakonec v listech. Autoři zjistili, že signál dostupnosti dusíku v rostlině předává genům cytokinin. Potvrdili tak, že cytokinin působí jako signál na dlouhou vzdálenost, mezi kořenem a prýtem, indikující dostupnost dusíku rostlině (Takei et al., 2001b). Následně také zjistili, že dusičnany indukují expresi *IPT* (*AtIPT3*), a tím podporují biosyntézu cytokininů a zvyšují míru jejich translokace (Takei et al., 2004a).

### 3.1.6 Cytokininová signalizační kaskáda

Mezi rostlinnými růstovými regulátory hraje cytokinin společně s auxinem významnou roli. Spouští signální kaskádu, která má následující obecný průběh: navázání cytokininu na vysoko afinitní receptorový protein za konformační změny proteinu, která zahájí signální transdukční kaskádu (fosforylace/defosforylace His/Asp postranního řetězce regulátoru), vedoucí ke změnám transkripce specifických genů (Mizuno, 2005). Přenos signálu je podobný dvousložkovému signalizačnímu systému, využívanému bakteriemi (Parkinson, 1993). U *Arabidopsis* probíhá přenos cytokininového signálu následujícím způsobem (mechanismus phosphorelay, viz obr. 4). Nejprve se cytokinin naváže na histidin-protein kinázové receptory na cytoplasmatické membráně nebo membráně endoplasmatického retikula (ER) (Caesar et al., 2011), konkrétně AHK2, AHK3 a AHK4 (také nazvané CRE1/WOL1) (Yamada et al., 2001). Vazba na receptory indukuje konformační změny, které spustí přenos fosfátu z receptorové na regulační doménu (phosphorelay). Konkrétně se aktivuje autofosforylace His a fosfátová skupina je přenesena prostřednictvím Asp zbytku na konzervovaný His na konkrétní AHP v cytoplasmě.



obr. 4 – Cytokininová signalizace: **mechanismus phosphorelay**. Vazba cytokininu na receptory histidin kináz (AHK 2-4) lokalizované v ER nebo CPM. Navázání na receptory spustí konformační změnu, která zahájí přenos fosfátové skupiny (P). Nejprve je fosfát přenesen z konzervovaného His (H) na Asp (D) zbytek receptoru a následně je předán na skupinu histidin fosfotransferáz (AHP1-5). AHP fosfotransferázy se translokují do jádra a fosforylují regulátory ARRs (*Arabidopsis* response regulators). Fosforylace ARRs typu B umožní těmto regulátorům navázat se na DNA a zahájit transkripci různých regulačních genů. Včetně ARRs typu A, které inhibují cytokininovou signalizaci. Fosforylace ARRs typu A působí stabilizačně pro regulátory tohoto typu. Převzato a upraveno z: El-Showk et al., 2013

Produkty genové rodiny *ARABIDOPSIS HIS PHOSPHOTRANSFER PROTEINS* (AHPs) působí jako můstek při transportu fosfátu mezi Asp zbytkem AHK na ER a příjmovou doménou proteinu ARR (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR*) regulujícího odpověď na signál (Imamura et al., 1999; Kakimoto, 2003; Suzuki et al., 2000). AHP přenesou fosfát na ARRs typu B, lokalizované v jádře. ARRs typu B regulují expresi mnohých genů, včetně ARRs typu A. Dráha je negativně regulována ARRs typu A, které jsou stabilizovány fosforylací, indukovanou cytokininy. Ve fosforylovaném stavu působí negativně na cytokininovou dráhu, pravděpodobně prostřednictvím fosfo-specifických interakcí s cílovými proteiny (To et al., 2007) či soutěží s ARRs typu B o fosforylaci prostřednictvím AHP proteinů (Imamura et al., 1998). V pozitivní regulaci vystupují ARRs typu B, transkripční faktory, které jsou přímo nezbytné pro řízení cytokininem-regulované genové exprese (Mason et al., 2005). Podrobně je dráha signalizace cytokininem popsána např. v El-Showk et al., 2013.

## **3.2 Specifické působení cytokininů v rostlině**

### **3.2.1 Působení cytokininů v rámci celé rostliny**

Cytokininy ovlivňují jak vnitřní procesy, odehrávající se v rostlině, tak i odpověď rostliny na působení vnějších faktorů. Nejprve se zmíním o vlivu cytokininů na vnitřní vývojové procesy rostliny. Klíčovou roli cytokininy hrají v regulaci vrcholového meristému prýtu a kořene (Werner et al., 2003; Werner et al., 2001), což podrobněji rozeberu dále. V prýtu cytokininy dále regulují komunikaci zdroje a sinku, také se účastní regulace spuštění senescence listů a kontroly růstu kambia. V kořeni pozitivně ovlivňují diferenciaci cév. Studie na mutantních a transgenních rostlinách prokázaly, že cytokininy negativně ovlivňují tvorbu postranních kořenů. Odpověď rostliny na působení určitých vnějších faktorů je také regulována cytokininy. Například cytokininy a světlo společně regulují mnoho procesů, odehrávajících se v rostlině. Cytokininy ovlivňují transkripci hlavních regulátorů denních rytmů. Jsou zapojeny i v reakci vyhýbání se stínu, která zahrnuje zastavení růstu listových primordií a zrychlené prodlužování stonku. Cytokininy v tomto případě zprostředkovávají zastavení růstu listových primordií. Na přizpůsobení fotosyntetického aparátu v hustě zastíněných místech mají cytokininy také vliv. Do zastíněných listů je importováno méně cytokininů syntetizovaných v kořeni. V kořeni cytokininy pomáhají rostlině vyrovnat se s lokálními rozdíly v dostupnosti minerálních látek. Signalizují dostupnost dusíku od kořene k prýtu a mezi vegetativními a reprodukčními orgány, podílí se i na regulaci jeho asimilace. Účastní se signalizace dostupnosti fosfátu a síry i regulace příjmu železa z půdy. Dokonce i organismy působící

patogenně či symbioticky na rostlinný vývoj, využívají cytokininy k modifikaci růstu hostitele. Například patogenní *Agrobacterium tumefaciens* mění hostitelský buněčný cyklus ve svůj prospěch produkcí cytokininů, zajištěnou bakterií kódovanými *ipt* geny. Ze symbiontů mohou uvést třeba houbu *Piriformosa indica*, která stimuluje růst rostlin vlastní produkcí vysokých množství cytokininů. Působení cytokininů v rostlinném vývoji je dopodrobna shrnuto v review: Werner and Schmuelling, 2009.

### **3.2.2 Porovnání vlivu cytokininů na vrcholový meristém stonku a kořene**

Cytokininy hrají důležitou roli v dělivých pletivech rostlin, regulují SAM stimulací buněčného dělení a vrcholový meristém kořene (ROOT APICAL MERISTEM, RAM) podpořením buněčné diferenciaci (Werner et al., 2001). Werner *et al.* v roce 2001 experimenty s rostlinami se sníženým obsahem endogenních cytokininů odhalili, jak cytokininy ovlivňují morfogenezi rostlin. Připravili transgenní rostliny *Nicotiana tabacum*, které měly zvýšené množství cytokininoxidáz, a tím redukováný obsah cytokininů. Tyto rostliny vykazovaly zpomalené dělení buněk SAM i listových primordií. Cytokininy mají dvojí roli v pozitivní regulaci vývoje SAM. Jednak udržují buněčné dělení, ale také podporují diferenciaci buněk. Nezbytné jsou cytokininy při vývoji listů, kdy se podílejí na regulaci buněčného cyklu a zajišťují optimální počet buněčných dělení pro normální velikost listů. Naopak v kořenovém růstu mají cytokininy negativní regulační roli. Snížený obsah cytokininů působí v kořeni prodloužení meristematické fáze s vyšším počtem dělení buněk před vstupem do elongační fáze (Werner et al., 2001). Podobné fenotypové projevy měly i transgenní rostliny *Arabidopsis*, se zvýšenou expresí cytokininoxidázy, což potvrzuje funkci cytokininu v SAM a RAM (Werner et al., 2003). Výzkum na cytokinin-deficitních rostlinách a rostlinách se zvýšenou expresí *CKX* tedy ukázal, že cytokininy působí na morfogenezi rostlin převážně prostřednictvím regulace buněčného cyklu.

### **3.2.3 Působení cytokininů na dělení buněk v rámci SAM**

Jak již bylo krátce zmíněno, růst apikálního meristému prýtu je regulován vedle dalších fytohormonů také cytokininy. Konkrétně podpora buněčného dělení a spolupráce s dalšími signály na ustanovení organizace SAM jsou dva hlavní body cytokininové aktivity v apikálním meristému prýtu. Organizace SAM závisí na buněčně neautonomní zpětnovazební dráze, kde WUSCHEL (WUS) indukuje expresi *CLAVATA3* (*CLV3*), který negativně reguluje expresi *WUS* prostřednictvím *CLAVATA1* (*CLV1*) receptoru. Dráha WUS-CLV3 prostorově definuje organizační centrum a udržuje buňky klidového centra v nediferencovaném stavu (Schoof et al., 2000). Funkci cytokininů v SAM demonstrují

experimenty, kdy byla podpořena degradace cytokininů, narušena jejich biosyntéza či signalizační dráha, což vedlo k zakrslému fenotypu SAM (shrnutí v review: Kieber and Shaller, 2014). Mutace cytokininoxidázy nebo genu *ARRs typu A* naopak vyústilo ve fenotyp rostlin vykazující zvětšený SAM a zvýšenou expresi *WUS* (Leibfried et al., 2005). *WUS* redukuje biosyntézu cytokininů a exprese *WUS* je podpořena zvyšujícími se hladinami cytokininů (Chickarmane et al., 2012). Další interakce ovlivňující stavbu vrcholového meristému prýtu probíhá mezi cytokininy a SHOOT MERISTEMLESS (STM) transkripčním faktorem. STM aktivuje biosyntézu cytokininů v SAM, a tak pozitivně reguluje expresi *CYCD3* genů, které přispívají k udržení nediferencovaného stavu buněk klidového centra a zabránění endoreduplikaci (Scofield et al., 2013). Významným mediátorem cytokininového působení na SAM je oxid dusnatý (NO). Oxid dusnatý je znám jako signální molekula, která spouští buněčné dělení v buněčných kulturách. NO podporuje proliferaci buněk tkáňových kultur a podporuje cytokininovou indukci exprese *CYCD3;1* genu v semenáčcích *Arabidopsis*. Pokud není přítomen NO, aktivace tohoto genu cytokininy je inhibována (Shen et al., 2013).

#### **3.2.4 Působení cytokininů na dělení buněk v rámci RAM**

Apikální meristém kořene (RAM) je také ovlivněn cytokininy. Nejprve jen v krátkosti popíšu části apikálního meristému kořene z hlediska buněčných procesů, které v nich probíhají. Klidové centrum (QUIESCENT CENTER, QC) obsahuje pomalu se dělicí buňky (mitoticky neaktivní či málo aktivní) a iniciály na periferii (mitoticky aktivní buňky). Dceřiné buňky iniciál se dále dělí v mitoticky aktivní dělivé zóně a následně podstupují diferenciaci či elongaci v diferenciacní/elongační zóně. Místo, kde buňky ukončí buněčné dělení a začínají se diferencovat, se nazývá přechodová zóna. Cytokininy působí převážně v přechodové zóně (TRANSITION ZONE, TZ), kde regulují rovnovážný stav mezi buněčným dělením a diferenciací buněk ve prospěch diferenciaci (Dello Ioio et al., 2008). Nově bylo také zjištěno, že cytokininy hrají roli i v klidovém centru RAM, a to v regulaci dělení buněk QC (Zhang et al., 2013).

Je důležité zmínit, že na ustanovení meristemické aktivity RAM mají opačný vliv auxin a cytokinin. Auxin pozitivně ovlivňuje velikost dělivé zóny podpořením dělení buněk a cytokinin negativně podpořením diferenciaci buněk (Beemster and Baskin, 2000). Molekulární podstata působení cytokininu v RAM je inhibice auxinové aktivity prostřednictvím *ARRs* typu B. Tyto cytokininové transkripční faktory indukují expresi *SHY2* genu (inhibitor auxinem-regulované genové exprese). *SHY2* zabraňuje auxinové stimulaci buněčného dělení (Dello Ioio et al., 2008). Cytokininy také negativně ovlivňují hladiny

auxinových přenašečů z rodiny PIN (podporují degradaci PIN1), čímž redukuje aktivitu auxinu (Marhavy et al., 2011). Paradoxně opačnou funkci mají auxin a cytokinin v klidovém centru RAM. Auxin je důležitý pro stanovení nedělivého charakteru klidového centra (Sabatini et al., 1999) a cytokinin charakter QC ovlivňuje negativně. Exogenní aplikace zeatinu či deaktivace některých genů *ARRs typu A*, a tím zvýšená aktivita cytokininů, totiž indukuje mitotickou aktivitu buněk QC, které se nemají dělit. Pro zachování klidového centra je tedy důležité prostředí s vysokými koncentracemi auxinů a naopak nízkými koncentracemi cytokininů. (Zhang et al., 2013).

## **4 Role cytokininů v regulaci buněčného cyklu rostlin**

Cytokiny významně regulují buněčný cyklus a konkrétně kontrolní body na přechodech fází G1/S a G2/M. Nejprve v krátkosti popíšu, jak cytokiny působí na G1/S fázový přechod, a poté se budu dopodrobna věnovat vlivu cytokininů na G2/M kontrolní bod.

### **4.1 Vliv cytokininů na G1/S přechod**

Zapojení cytokininů v této regulační dráze potvrzuje zjištění, že v G1 fázi vzrůstají hladiny zeatinu a na konci S fáze jsou významně zvýšené hladiny cytokininů zeatinového a dihydrozeatinového typu (Redig et al., 1996). Role cytokininů při G1/S přechodu spočívá v podpoře transkripce *CYCD3;1* (Riou-Khamlichi et al., 1999). Při G1/S přechodu záleží na množství *CYCD3;1* (Menges et al., 2006), který aktivuje komplexy CDKA;1-CYCD, a může dojít k fosforylaci Rb proteinů (Bonioti and Gutierrez, 2001). Následně se uvolní E2F faktory, které indukují expresi specifických genů S fáze, a buňka zahajuje replikaci (Uemukai et al., 2005).

### **4.2 Vliv cytokininů na regulaci G2/M přechodu**

#### **4.2.1 Důkaz zapojení cytokininů v regulaci G2/M**

Záměrem této práce je zmapovat dostupné informace o vlivu cytokininů na G2/M kontrolní bod buněčného cyklu. Zapojení cytokininů do regulace vstupu rostlin do mitózy dokazuje již několik prací. Na počátku vstupu do mitózy byla u suspenzní kultury tabákových buněk BY-2 prokázána přechodná akumulace cytokininů zeatinového typu (Redig et al., 1996). Pokud byl do suspenzní kultury přidán lovastatin, který specificky inhibuje biosyntézu cytokininů, akumulace zeatinu se v průběhu G2 fáze drasticky redukovala. Dokonce nastala i blokáda samotného G2/M přechodu tak, že v pozdní G2 fázi buňky nebyly schopny zahájit mitózu (Laureys et al., 1998). Po odstranění inhibičního vlivu lovastatinu a dodání zeatinu buňky mitózu obnovily (Crowell and Salaz, 1992).



#### 4.2.2 Podstata regulace cytokininem

Na základě zmíněných experimentů bylo možné uzavřít, že cytokininy jsou pravděpodobně u rostlin vyžadovány pro vstup do mitózy. Bylo však ještě nutné odhalit, jakým mechanismem cytokininy ovlivňují přechod z G2 do M fáze buněčného cyklu. Nejprve byly provedeny testy působení rostlinných regulátorů na dělení buněk. Odhalily vliv cytokininů na akumulaci a katalytickou aktivitu CDK (John et al., 1993). Hemerly *et al.* následně prokázali schopnost cytokininů (za současné přítomnosti auxinů) indukovat expresi *cdc2* genů v různých rostlinných pletivech (Hemerly et al., 1993). Zhang *et al.* (1996) testovali vliv cytokininů na rostliny tabáku (*Nicotiana plumbaginifolia* a *Nicotiana tabacum*). Vycházeli z již známého faktu, že průchod buněčným cyklem rostlin záleží na fosforylaci/defosforylaci a katalytické aktivitě CDK, zde konkrétně studovaného p34<sup>cdc2</sup>-like proteinu (34-kDa produkt kódovaný genem *cdc2*), dále jen CDK. Na explantátech dřeně stonku *N. tabacum* sledovali schopnost cytokininů (BAP) indukovat průchod buněčným cyklem. Po dodání pouze BAP do média bez hormonů nepozorovali ani zvětšování buněk, ani dělení. Aktivní proliferaci buněk zaznamenali až po dodání auxinů (NAA, kyselina naftyloctová) i cytokininů (BAP). Dále měřili hladiny CDK (p34<sup>cdc2</sup>-like proteinu) po přidání auxinů a cytokininů. Zajímavé je, že po dodání jen auxinů se hladiny CDK zvýšily více než čtyřicetkrát, zatímco dodání pouze cytokininů nezpůsobilo žádný nárůst. Samotný auxin ale nebyl schopný CDK aktivovat a pro aktivaci bylo nutné dodat do média auxin i cytokinin. Zjistili tedy, že cytokinin nedokáže indukovat syntézu CDK, ale je nezbytný pro její aktivaci. Dále chtěli přesně lokalizovat působení cytokininů v rámci buněčného cyklu, k tomu využili suspenzní kulturu buněk *N. plumbaginifolia*. Buňky tabáku striktně vyžadovaly cytokinin (kinetin) pouze v pozdní G2 fázi buněčného cyklu. Buňky bez kinetinu zůstávaly v G2 fázi a vykazovaly vysoké hladiny fosforylované neaktivní CDK (p34<sup>cdc2</sup>-like proteinu) (Zhang et al., 1996a).

Důležité je také zmínit, že hovoříme-li o CDK, nemyslíme monomerní CDK, ale komplex CDK-CYC, monomerní CDK je totiž neaktivní (Labbe et al., 1989). Cytokininy v rámci G2/M tedy, podle těchto prací, cílí na aktivitu CDK-CYC komplexů. Jejich signalizace vede k posttranslační modifikaci komplexu CDK-CYC, konkrétně defosforylaci aminokyselinového zbytku Y15 CDK a následné aktivaci komplexu (Zhang et al., 1996a).

#### 4.2.3 Nahrazení účinku cytokininů Spcdc25 fosfatázou

Funkci cytokininů chtěli vědci dále testovat. Otázkou zůstávalo, jakým mechanismem je cytokinin schopný indukovat defosforylaci CDK. Proto zjišťovali, jestli lze funkci cytokininů nahradit kvasinkovou CDC25 fosfatázou, Spcdc25 (CDC25 ze *Schizosaccharomyces pombe*) (Zhang et al., 1996a). V bakteriích *Escherichia coli* exprimovali Spcdc25, a výsledný enzym, u kterého je známé, že dokáže defosforylovat tyrozinový zbytek *in vitro* (Millar et al., 1991), použili pro experiment. Naprodukovaný Spcdc25 protein byl aplikován do suspenzní kultury tabákových buněk (*N. plumbaginifolia*), které byly zablokovány v G2 fázi BC kultivací v médiu<sup>9</sup> bez dodání cytokininů (BAP). Autoři potvrdili, že při zahájení a v průběhu mitózy lze funkci cytokininů *in vitro* nahradit dodáním Spcdc25 fosfatázy. Mitóza po dodání Spcdc25 fosfatázy byla dokončena stejně rychle jako po stimulaci cytokininy a dceřiné buňky byly plně životaschopné. Pokud cytokininy nebyly přidány do média, hromadila se inaktivovaná CDK s vysokými hladinami fosforylovaného tyrozinu (Zhang et al., 1996a). Zhang et al. (2005) i Orchard et al. (2005) následně předložili další důkazy, že cytokininy mají na úrovni rostlinných pletiv funkci v regulaci fosforylace CDK. Potvrdili, že přítomnost cytokininů může být *in vitro* nahrazena Spcdc25 fosfatázou. Tentokrát nevyužili enzym Spcdc25, ale exprimovali kvasinkovou Spcdc25 v tabákových buňkách. V buněčné kultuře BY-2, kde byla zablokována cytokininová biosyntéza lovastatinem, a tím i G2/M přechod, dokázala exprese Spcdc25 aktivovat přechod z G2 do M fáze i přesto, že hladiny endogenních cytokininů poklesly na hranici detekce. Buňky exprimující Spcdc25 se dělily předčasně a vykazovaly tak menší velikost než u kontrolní varianty (Orchard et al., 2005). Substituce cytokininů expresí Spcdc25 zvýšila hladiny Tyr-defosforylované CDK. Zvýšené množství rostlinné Tyr-defosforylované CDK tedy signalizuje vysoké koncentrace cytokininů (Zhang et al., 2005).

#### 4.2.4 Identita CDK-CYC komplexu aktivovaného rostlinnou Tyr fosfatázou

Zhang et al. v roce 2005 předložili důkazy, že stimulace posttranslační aktivace komplexu CDK-CYC je primárním mechanismem působení cytokininů v mitóze, a není pouze důsledkem jiného účinku cytokininů v rámci rostliny. Znovu využili exprese Spcdc25 fosfatázy, která dokázala spustit mitózu v buňkách zablokováných v G2 fázi při nedostatku cytokininů. Testovali hypotézu, že konkrétní kinázou, kterou aktivovala Spcdc25 fosfatáza (a potažmo i potenciální rostlinná Tyr fosfatáza stimulovaná cytokininem) u *Nicotiana plumbaginifolia* je CDKA;1. V přímé souvislosti se vzrůstající CDKA;1 aktivitou a snižujícím se množstvím fosforylovaného tyrozinu na CDKA;1, rostla aktivita Spcdc25

---

<sup>9</sup> Médium – živné prostředí, ve kterém buňky rostou, je buď tekuté (v tomto případě) nebo i pevné.

fosfatázy. Indukce cytokininy v buňkách WT vedla k defosforylaci CDKA;1, z čehož vyvodili, že vzrostla aktivita zatím neznámé rostlinné Tyr fosfatázy. Defosforylace CDKA;1 po indukci cytokininy neznámou Tyr fosfatázou byla navíc silnější než defosforylace Spcdc25 fosfatázou. Je logické tedy předpokládat, že rostlinná Tyr fosfatáza účinkuje v regulaci G2/M přechodu, i když zatím nebyla identifikována (Zhang et al., 2005). Také Orchard *et al.* (2005) využili expresi *Spcdc25* ke studiu G2/M přechodu u buněčné linie BY-2 tabákových buněk. Testovali, jak je ovlivňována aktivita cyklin-dependentních kináz CDKA;1 a CDKB1 expreseí *Spcdc25* (v buňkách nazývaných *Spcdc25EC*) v porovnání s buňkami s prázdným vektorem (EV) a buňkami netransformovanými (WT). Zjistili, že v *Spcdc25EC* je zvýšená aktivita CDKB1 v časně S fázi (kde byla zvýšená i v EV buňkách), ale navíc i na přechodu S/G2 fáze a v časně M fázi. V buňkách s prázdným vektorem měla aktivita CDKB1 izolovaný vrchol v časně S fázi (Orchard et al., 2005). V nezávislém experimentu bylo zjištěno, že u WT buněk aktivita vzrostla na maximum na G2/M přechodu (Porceddu et al., 2001). Rozdílné výsledky byly pozorovány u aktivity CDKA;1 v *Spcdc25EC*. Byla konstantní v S a časně G2 fázi, následně vzrostla na G2/M přechodu a maxima dosahovala na rozhraní M a G1 fáze. V EV vykazovala CDKA;1 aktivita podobný průběh jako u WT, kdy byl pozorován nejvyšší vrchol v S fázi a poté vysoká aktivita na přechodu S/G2 fází. Exprese *Spcdc25* měla tedy podle autorů největší vliv na aktivitu tabákové CDKB1 kinázy, která byla v *Spcdc25EC* stále vysoká (oproti EV) a způsobila i předčasný vstup těchto buněk do mitózy. Důležité je zmínit, že za normálních podmínek CDKB1 aktivita vykazuje jediný vrchol na přechodu G2/M narozdíl od CDKA;1. Navíc B typ CDK u *Arabidopsis* funguje pouze v G2 a M fázích a je unikátní pro rostliny. Nicméně jak u tabáku, tak u *Arabidopsis* je CDKA;1 aktivita vysoká v průběhu S, G2 a M fází (Orchard et al., 2005). V důsledku tedy není jasné, kterou z kináz aktivuje *Spcdc25* fosfatáza a potažmo i neidentifikovaná výše zmíněná rostlinná Tyr fosfatáza. Neopomenutelná je v této úvaze i již zmíněná antifosfatáza PAS2, která se váže na fosforylovanou CDKA;1 a neumožní její defosforylaci (Da Costa et al., 2006). Autoři článku naznačují, že PAS2 a cytokininy mají antagonistický účinek na aktivitu CDC25-like fosfatázy a následně i celého buněčného dělení. Navrhují následující model regulace G2/M přechodu: WEE1 kináza fosforyluje CDKA;1 a PAS2 ji udržuje ve fosforylovaném inaktivním stavu. Tím zabraňuje její předčasné defosforylaci fosfatázou a potažmo předčasné mitóze. Buněčné dělení je následně iniciováno po aktivaci CDC25-like fosfatázy prostřednictvím cytokininové signalizace. Mechanismus odstranění PAS2 není zatím vyjasněn, ale jsou předpokládány 2 možnosti. Zvýšení aktivity CDC25-like fosfatázy na počátku mitózy je dostatečné pro

defosforylaci CDKA;1, a tudíž odstranění PAS2, nebo je PAS2 aktivně odstraněn zatím neznámým způsobem (Da Costa et al., 2006).

V dřívějších experimentech navrhli Zhang *et al.* (1996), že komplex aktivovaný cytokininem indukovanou rostlinnou Tyr fosfatázou je CDK-CYCB. Inhibiční fosforylaci rostlinné CDK, p34<sup>cdc2</sup>-like, u buněk dřeně *Nicotiana tabacum* je možné *in vitro* odstranit prostřednictvím Spcdc25 fosfatázy, izolované z kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* a produkované v *Escherichia coli*. Spcdc25 fosfatáza je směřována ke komplexu CDK-CYCB a aktivuje tento komplex v zablokovaných buňkách. Tyto důkazy naznačovaly, že cílovým enzymem by mohl být právě CDK-CYCB (Zhang et al., 1996). V pozdějších experimentech (Zhang et al., 2005) ale navrhuje konkrétně CDKA;1 jako kinázu aktivovanou rostlinnou Tyr fosfatázou. Jenže CDKA;1 se na přechodu G2/M fází pojí preferenčně s CYCD3;1, což bylo zjištěno až později (Van Leene et al., 2010). Můžeme tak předpokládat, že hledanými komplexy mohou být CDKA;1-CYCD3;1 nebo CDKB1-CYCA2/B3 či CDKB2-CYCB1, poněvadž CDKB1 se na G2/M přechodu BC pojí přednostně s CYCA2 a CYCB (Vanneste et al., 2011).

#### **4.2.5 Shrnutí cytokininové signalizace v G2/M**

Cytokiny působí aktivaci zatím neznámé rostlinné Tyr fosfatázy, která defosforyluje Y15 v aktivním místě enzymového komplexu CDK-CYC, pravděpodobně CDKA;1-CYCD3;1, CDKB1-CYCA2/CYCB3 či CDKB2-CYCB1, a tím umožní vstup do mitózy. V experimentálních modelech jsou buňky bez cytokininů zablokovány v G2 fázi a mohou být stimulovány k mitóze buď *in planta* po dodání cytokininů, nebo v buněčné suspenzi expresí transgenní Tyr fosfatázy. Navíc je tato fosfatázová aktivita nízká za nepřítomnosti cytokininů a stoupá až do normálních hladin při jejich dodání. Tyto výsledky naznačují, že by v rostlinách mohl fungovat model regulace G2/M přechodu s následujícím schématem: cytokiny  $\Rightarrow$  CDC25-like/neznámá Tyr fosfatáza  $\Rightarrow$  CDKA;1/CDKB  $\Rightarrow$  G2/M. (Zhang et al., 1996b; Zhang et al., 2005).

## 5 Závěr

Regulace buněčného cyklu u rostlin je komplexně řízený proces, který stále skrývá svá tajemství. Je zajímavé, že vstup do mitózy je u kvasinek i živočichů dobře prozkoumán, ale u rostlin doposud neznáme základní mechanismy regulující tento krok. Je překvapivé, že se v oblasti výzkumu regulace G2/M přechodu u rostlin téměř 10 let neúčinnily žádné přelomové objevy. Sporná je funkce fosforylačního místa T14 na CDKA;1, které je u kvasinek a živočichů v G2 fázi fosforylováno WEE1 kinázou. Za odstranění tohoto inhibičního fosfátu zodpovídá CDC25 fosfatáza, která je zásadní pro vstup kvasinkových a živočišných buněk do mitózy. Nebylo potvrzeno, že by rostlinný homolog WEE1 fosforyloval T14, a nemáme ani přímé důkazy o interakci rostlinné CDC25 fosfatázy s tímto místem. Proto je možné, že u rostlin inhibiční fosforylace T14 nehraje tak zásadní roli. Zapojení CDC25-fosfatázy v regulaci G2/M přechodu u vyšších rostlin je tedy nejasné a ze zjištěných faktů vyplývá, že nejspíš nemá stejnou úlohu, jako v kvasinkovém a živočišném buněčném cyklu. Jak je vidět, rostlinný buněčný cyklus se v mnohém podobá živočišnému, ale určité regulační komponenty, jako například fytohormony či cyklin-dependentní kinázy typu B, jsou pro rostlinu jedinečné. A právě tyto regulátory hrají mnohdy klíčové role v kontrolních bodech buněčného cyklu rostlin. Existují i teorie, které tvrdí, že CDC25 fosfatáza byla u vyšších rostlin nahrazena jiným regulačním mechanismem, například souhrou antifosfatázy, neznámé Tyr fosfatázy a cytokininů, nebo specificky řízenou aktivací CDKB1;1 kinázy.

Úloha cytokininů je v rámci buněčného cyklu dobře popsána převážně v kontrolním bodě na přechodu fází G1/S. Cytokiny zde podporují transkripci CYCD3;1, který je limitující pro formaci klíčových komplexů CDKA;1-CYCD umožňujících následný vstup do mitózy. V G2/M kontrolním bodě je situace komplikovanější. Předpokládá se, že cytokinin funguje jako aktivátor zatím neznámé Tyr fosfatázy. Rostlinná Tyr fosfatáza defosforyluje Y15 v aktivním místě komplexu CDK-CYC (jehož identita také nebyla potvrzena), a tím umožní buňce vstup do mitózy. I kdyby byl tento regulační mechanismus správně navržen, stále zbývá mnoho nezodpovězených otázek: „Jaká je identita rostlinné Tyr fosfatázy?“, „Které komplexy CDK-CYC jsou zásadní pro G2/M kontrolní bod?“ a „Jakou hraje u rostlin roli fosforylační místo T14?“. Cílem budoucích let je, najít k těmto otázkám uspokojivé odpovědi.

## 6 Seznam použité literatury

- Astot C, Dolezal K, Nordstrom A, Wang Q, Kunkel T, Moritz T, Chua NH and Sandberg G (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:14778-14783.
- Barciszewski J, Siboska GE, Pedersen BO, Clark BFC and Rattan SIS (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *Febs Letters* **393**:197-200.
- Bassil NV, Mok DWS and Mok MC (1993) PARTIAL-PURIFICATION OF A CIS-TRANS-ISOMERASE OF ZEATIN FROM IMMATURE SEED OF PHASEOLUS-VULGARIS L. *Plant Physiology* **102**:867-872.
- Beemster GT and Baskin TI (2000) Stunted plant 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**:1718-1727.
- Boniotti MB and Gutierrez C (2001) A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex. *Plant Journal* **28**:341-350.
- Boudolf V, Inze D and De Veylder L (2006) What if higher plants lack a CDC25 phosphatase. *Trends in Plant Science* **11**:474-479.
- Boudolf V, Lammens T, Boruc J, Van Leene J, Van Den Daele H, Maes S, Van Isterdael G, Russinova E, Kondorosi E, Witters E, De Jaeger G, Inze D and De Veylder L (2009) CDKB1;1 Forms a Functional Complex with CYCA2;3 to Suppress Endocycle Onset. *Plant Physiology* **150**:1482-1493.
- Caesar K, Thamm AMK, Witthoeft J, Elgass K, Huppenberger P, Grefen C, Horak J and Harter K (2011) Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany* **62**:5571-5580.
- Chickarmane VS, Gordon SP, Tarr PT, Heisler MG and Meyerowitz EM (2012) Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:4002-4007.
- Churchman ML, Brown ML, Kato N, Kirik V, Huelskamp M, Inze D, De Veylder L, Walker JD, Zheng Z, Oppenheimer DG, Gwin T, Churchman J and Larkin JC (2006) SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **18**:3145-3157.
- Corellou F, Camasses A, Ligat L, Peaucellier G and Bouget FY (2005) Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiology* **138**:1627-1636.
- Crowell DN and Salaz MS (1992) INHIBITION OF GROWTH OF CULTURED TOBACCO CELLS AT LOW CONCENTRATIONS OF LOVASTATIN IS REVERSED BY CYTOKININ. *Plant Physiology* **100**:2090-2095.
- Da Costa M, Bach L, Landrieu I, Bellec Y, Catrice O, Brown S, De Veylder L, Lippens G, Inze D and Faure J-D (2006) Arabidopsis PASTICCINO2 is an antiphosphatase involved in regulation of cyclin-dependent kinase A. *Plant Cell* **18**:1426-1437.
- De Schutter K, Joubes J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Babiychuk E, Van Der Schueren E, Beeckman T, Kushnir S, Inze D and De Veylder L (2007) Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* **19**:211-225.
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GTS, Krols L, Terras P, Landrieu I, Van der Schueren E, Maes S, Naudts M and Inze D (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**:1653-1667.
- De Veylder L, Segers G, Glab N, Casteels P, Van Montagu M and Inze D (1997) The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *Febs Letters* **412**:446-452.
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P and Sabatini S (2008) A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* **322**:1380-1384.

- Denhaese GJ, Walworth N, Carr AM and Gould KL (1995) THE WEE1 PROTEIN-KINASE REGULATES T14 PHOSPHORYLATION OF FISSION YEAST CDC2. *Molecular Biology of the Cell* **6**:371-385.
- Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V and Murray JAH (2007) Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:14537-14542.
- Doonan JH and Kitsios G (2009) Functional Evolution of Cyclin-Dependent Kinases. *Molecular Biotechnology* **42**:14-29.
- El-Showk S, Ruonala R and Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**:1373-1383.
- Emery RJN, Leport L, Barton JE, Turner NC and Atkins CA (1998) cis-Isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiology* **117**:1515-1523.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D and Hunt T (1983) CYCLIN - A PROTEIN SPECIFIED BY MATERNAL MESSENGER-RNA IN SEA-URCHIN EGGS THAT IS DESTROYED AT EACH CLEAVAGE DIVISION. *Cell* **33**:389-396.
- Galichet A, Hoyerova K, Kaminek M and Gruissem W (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**:1155-1164.
- Gillissen B, Burkle L, Andre B, Kuhn C, Rentsch D, Brandl B and Frommer WB (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in arabidopsis. *Plant Cell* **12**:291-300.
- Glötzer M, Murray AW and Kirschner MW (1991) CYCLIN IS DEGRADED BY THE UBIQUITIN PATHWAY. *Nature* **349**:132-138.
- Golovko A, Sitbon F, Tillberg E and Nicander B (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **49**:161-169.
- Gonzalez N, Gevaudant F, Hernould M, Chevalier C and Mouras A (2007) The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *Plant Journal* **51**:642-655.
- Grafi G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins BA, DeCaprio JA, Sellers WR and Kaelin WG (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: Involvement in endoreduplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:8962-8967.
- Harashima H, Dissmeyer N and Schnittger A (2013) Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology* **23**:345-356.
- Hartwell LH (1974) SACCHAROMYCES-CEREVISIAE CELL-CYCLE. *Bacteriological Reviews* **38**:164-198.
- Hemerly AS, Ferreira P, Engler JD, Vanmontagu M, Engler G and Inze D (1993) CDC2A EXPRESSION IN ARABIDOPSIS IS LINKED WITH COMPETENCE FOR CELL-DIVISION. *Plant Cell* **5**:1711-1723.
- Hirayama T, Imajuku Y, Anai T, Matsui M and Oka A (1991) IDENTIFICATION OF 2 CELL-CYCLE-CONTROLLING CDC2 GENE HOMOLOGS IN ARABIDOPSIS-THALIANA. *Gene* **105**:159-165.
- Hirose N, Makita N, Yamaya T and Sakakibara H (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology* **138**:196-206.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H and Sakakibara H (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* **59**:75-83.
- Hwang I, Sheen J and Mueller B (2012) Cytokinin Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63 **63**:353-380.
- Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T and Mizuno T (1999) Compilation and characterization of Arabidopsis thaliana response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology* **40**:733-742.

- Imamura A, Hanaki N, Umeda H, Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi C and Mizuno T (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:2691-2696.
- Ito M, Araki S, Matsunaga S, Itoh T, Nishihama R, Machida Y, Doonan JH and Watanabe A (2001) G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**:1891-1905.
- Iwakawa H, Shinmyo A and Sekine M (2006) Arabidopsis CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *Plant Journal* **45**:819-831.
- John PCL, Sek FJ and Lee MG (1989) A HOMOLOG OF THE CELL-CYCLE CONTROL PROTEIN P34CDC2 PARTICIPATES IN THE DIVISION CYCLE OF CHLAMYDOMONAS, AND A SIMILAR PROTEIN IS DETECTABLE IN HIGHER-PLANTS AND REMOTE TAXA. *Plant Cell* **1**:1185-1193.
- John PCL, Zhang K, Dong C, Diederich L and Wightman F (1993) P34(CDC2) RELATED PROTEINS IN CONTROL OF CELL-CYCLE PROGRESSION, THE SWITCH BETWEEN DIVISION AND DIFFERENTIATION IN TISSUE-DEVELOPMENT, AND STIMULATION OF DIVISION BY AUXIN AND CYTOKININ. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**:503-526.
- Joubes J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inze D, Umeda M and Renaudin JP (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology* **43**:607-620.
- Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate : ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**:677-685.
- Kakimoto T (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* **54**:605-627.
- Khadaroo B, Robbins S, Ferraz C, Derelle E, Eychenie S, Cooke R, Peaucellier G, Delseny M, Demaille J, Van de Peer Y, Picard A and Moreau H (2004) The first green lineage cdc25 dual-specificity phosphatase. *Cell Cycle* **3**:513-518.
- Kieber JJ and Shaller GE (2014) Cytokinins, in *The Arabidopsis Book* **11**:e0168 doi:10.1199/tab0168. p<sup>^</sup>pp.
- Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Uchimiya H and Umeda M (2003) Arabidopsis D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiology* **132**:1315-1321.
- Kudo T, Kiba T and Sakakibara H (2010) Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**:53-60.
- Kumagai A and Dunphy WG (1991) THE CDC25 PROTEIN CONTROLS TYROSINE DEPHOSPHORYLATION OF THE CDC2 PROTEIN IN A CELL-FREE SYSTEM. *Cell* **64**:903-914.
- Labbe JC, Capony JP, Caput D, Cavadore JC, Derancourt J, Kaghad M, Lelias JM, Picard A and Doree M (1989) MPF FROM STARFISH OOCYTES AT 1ST MEIOTIC METAPHASE IS A HETERODIMER CONTAINING 1 MOLECULE OF CDC2 AND 1 MOLECULE OF CYCLIN-B. *Embo Journal* **8**:3053-3058.
- Landrieu I, da Costa M, De Veylder L, Dewitte F, Vandepoele K, Hassan S, Wieruszeski JM, Faure JD, Van Montagu M, Inze D and Lippens G (2004) A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:13380-13385.
- Laureys F, Dewitte W, Witters E, Van Montagu M, Inze D and Van Onckelen H (1998) Zeatin is indispensable for the G(2)-M transition in tobacco BY-2 cells. *Febs Letters* **426**:29-32.
- Lees EM and Harlow E (1993) SEQUENCES WITHIN THE CONSERVED CYCLIN BOX OF HUMAN CYCLIN-A ARE SUFFICIENT FOR BINDING TO AND ACTIVATION OF CDC2 KINASE. *Molecular and Cellular Biology* **13**:1194-1201.
- Leibfried A, To JPC, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ and Lohmann JU (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**:1172-1175.
- Letham DS (1963) ZEATIN, A FACTOR INDUCING CELL DIVISION ISOLATED FROM ZEA-MAYS. *Life Sciences*:569-573.



- Marhavy P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, Parezova M, Petrasek J, Friml J, Kleine-Vehn J and Benkova E (2011) Cytokinin Modulates Endocytic Trafficking of PIN1 Auxin Efflux Carrier to Control Plant Organogenesis. *Developmental Cell* **21**:796-804.
- Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR and Schaller GE (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**:3007-3018.
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W and Murray JAH (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant Journal* **41**:546-566.
- Menges M, Samland AK, Planchais S and Murray JAH (2006) The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**:893-906.
- Millar JBA, McGowan CH, Lenaers G, Jones R and Russell P (1991) P80CDC25 MITOTIC INDUCER IS THE TYROSINE PHOSPHATASE THAT ACTIVATES P34CDC2 KINASE IN FISSION YEAST. *Embo Journal* **10**:4301-4309.
- Miller CO, Skoog F, Okumura FS, Vonsaltza MH and Strong FM (1955a) STRUCTURE AND SYNTHESIS OF KINETIN. *Journal of the American Chemical Society* **77**:2662-2663.
- Miller CO, Skoog F, Vonsaltza MH and Strong FM (1955b) KINETIN, A CELL DIVISION FACTOR FROM DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *Journal of the American Chemical Society* **77**:1392-1392.
- Mitchison JM (1971) The biology of the cell cycle, CUP Archive. p<sup>^</sup>pp.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M and Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* **37**:128-138.
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G and Kakimoto T (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:16598-16603.
- Mizuno T (2005) Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**:2263-2276.
- Mok DWS and Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**:89-118.
- Mok MC, Mok DWS, Turner JE and Mujar CV (1987) BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF CYTOKININ-ACTIVE PHENYLUREA DERIVATIVES IN TISSUE-CULTURE SYSTEMS. *Hortscience* **22**:1194-1197.
- Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**:261-291.
- Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG and Cheikh NN (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**:328-333.
- Nowack MK, Harashima H, Dissmeyer N, Zhao XA, Bouyer D, Weimer AK, De Winter F, Yang F and Schnittger A (2012) Genetic Framework of Cyclin-Dependent Kinase Function in Arabidopsis. *Developmental Cell* **22**:1030-1040.
- Nurse P (1990) UNIVERSAL CONTROL MECHANISM REGULATING ONSET OF M-PHASE. *Nature* **344**:503-508.
- Nurse P and Bissett Y (1981) GENE REQUIRED IN G-1 FOR COMMITMENT TO CELL-CYCLE AND IN G-2 FOR CONTROL OF MITOSIS IN FISSION YEAST. *Nature* **292**:558-560.
- Nurse PM (2002) Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Bioscience Reports* **22**:487-499.
- Orchard CB, Siciliano I, Sorrell DA, Marchbank A, Rogers HJ, Francis D, Herbert RJ, Suchomelova P, Lipavska H, Azmi A and Van Onckelen H (2005) Tobacco BY-2 cells expressing fission yeast cdc25 bypass a G2/M block on the cell cycle. *Plant Journal* **44**:290-299.
- Parkinson JS (1993) SIGNAL-TRANSDUCTION SCHEMES OF BACTERIA. *Cell* **73**:857-871.

- Porceddu A, Stals H, Reichheldt JP, Segers G, De Veylder L, Barroco RD, Casteels P, Van Montagu M, Inze D and Mironov V (2001) A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G(2)/M progression in plants. *Journal of Biological Chemistry* **276**:36354-36360.
- Ramirez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB and Gutierrez C (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Research* **27**:3527-3533.
- Redig P, Shaul O, Inze D, VanMontagu M and VanOnckelen H (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *Febs Letters* **391**:175-180.
- Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inze D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrell DA, Sundaresan V and Murray JAH (1996) Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology* **32**:1003-1018.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqumard A and Murray JAH (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**:1541-1544.
- Russell P and Nurse P (1987) NEGATIVE REGULATION OF MITOSIS BY WEE1+, A GENE ENCODING A PROTEIN-KINASE HOMOLOG. *Cell* **49**:559-567.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P and Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**:463-472.
- Schmitz RY, Skoog F, Playtis AJ and Leonard NJ (1972) CYTOKININS - SYNTHESIS AND BIOLOGICAL-ACTIVITY OF GEOMETRIC AND POSITION ISOMERS OF ZEATIN. *Plant Physiology* **50**:702-705.
- Schnittger A, Schobinger U, Stierhof YD and Hulskamp M (2002) Ectopic B-Type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating Arabidopsis trichomes. *Current Biology* **12**:415-420.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jurgens G and Laux T (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**:635-644.
- Scofield S, Dewitte W, Nieuwland J and Murray JAH (2013) The Arabidopsis homeobox gene SHOOT MERISTEMLESS has cellular and meristem-organisational roles with differential requirements for cytokinin and CYCD3 activity. *Plant Journal* **75**:53-66.
- Shen Q, Wang Y-T, Tian H and Guo F-Q (2013) Nitric Oxide Mediates Cytokinin Functions in Cell Proliferation and Meristem Maintenance in Arabidopsis. *Molecular Plant* **6**:1214-1225.
- Shimotohno A, Ohno R, Bisova K, Sakaguchi N, Huang J, Koncz C, Uchimiya H and Umeda M (2006) Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis. *Plant Journal* **47**:701-710.
- Sorrell DA, Chrimes D, Dickinson JR, Rogers HJ and Francis D (2005) The Arabidopsis CDC25 induces a short cell length when overexpressed in fission yeast: evidence for cell cycle function. *New Phytologist* **165**:425-428.
- Sorrell DA, Marchbank A, McMahon K, Dickinson JR, Rogers HJ and Francis D (2002) A WEE1 homologue from Arabidopsis thaliana. *Planta* **215**:518-522.
- Sorrell DA, Menges M, Healy JMS, Deveau Y, Amano C, Su Y, Nakagami H, Shinmyo A, Doonan JH, Sekine M and Murray JAH (2001) Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* **126**:1214-1223.
- Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**:674-688.
- Sun YJ, Dilkes BP, Zhang CS, Dante RA, Carneiro NP, Lowe KS, Jung R, Gordon-Kamm WJ and Larkins BA (1999) Characterization of maize (Zea mays L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:4180-4185.
- Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, Nakamura A, Ueguchi C and Mizuno T (2000) Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp

- phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**:2486-2489.
- Takei K, Sakakibara H and Sugiyama T (2001a) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**:26405-26410.
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M and Sugiyama T (2001b) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: Implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* **42**:85-93.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T and Sakakibara H (2004a) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **45**:1053-1062.
- Takei K, Yamaya T and Sakakibara H (2004b) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**:41866-41872.
- To JPC, Deruere J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE and Kieber JJ (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**:3901-3914.
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM and Morgan DO (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**:859-864.
- Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, de Jager S, Kato K, Kondorosi E, Murray JAH, Ito M, Shinmyo A and Sekine M (2005) Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Molecular Biology* **57**:83-100.
- Umeda M, Bhalerao RP, Schell J, Uchimiya H and Koncz C (1998) A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:5021-5026.
- Umeda M, Shimotohno A and Yamaguchi M (2005) Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant and Cell Physiology* **46**:1437-1442.
- Van Leene J, Boruc J, De Jaeger G, Russinova E and De Veylder L (2011) A kaleidoscopic view of the *Arabidopsis* core cell cycle interactome. *Trends in Plant Science* **16**:141-150.
- Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael G, Verkest A, Neiryneck S, Buffel Y, De Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PCG, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure J-D, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, Van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, De Veylder L, Van Onckelen H, Inze D, Witters E and De Jaeger G (2010) Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* **6**.
- Van't Hof J (1973) The regulation of cell division in higher plants, in *Brookhab Symposia*. p<sup>^</sup>pp 152-165.
- Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S and Inze D (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**:903-916.
- Vanneste S, Coppens F, Lee E, Donner TJ, Xie Z, Van Isterdael G, Dhondt S, De Winter F, De Rybel B, Vuylsteke M, De Veylder L, Friml J, Inze D, Grotewold E, Scarpella E, Sack F, Beemster GTS and Beeckman T (2011) Developmental regulation of CYCA2s contributes to tissue-specific proliferation in *Arabidopsis*. *Embo Journal* **30**:3430-3441.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H and Schmulling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**:2532-2550.
- Werner T, Motyka V, Strnad M and Schmulling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:10487-10492.

- Werner T and Schmuelling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**:527-538.
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T and Mizuno T (2001) The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**:1017-1023.
- Yamaguchi M, Umeda M and Uchimiya H (1998) A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Plant Journal* **16**:613-619.
- Zhang K, Letham DS and John PC (1996a) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* **200**:2-12.
- Zhang K, Letham DS and John PCL (1996b) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34(cdc2)-like H1 histone kinase. *Planta* **200**:2-12.
- Zhang KR, Diederich L and John PCL (2005) The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana glauca* cells can be satisfied by yeast cdc25 protein tyrosine phosphatase. Implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. *Plant Physiology* **137**:308-316.
- Zhang W, Swarup R, Bennett M, Schaller GE and Kieber JJ (2013) Cytokinin Induces Cell Division in the Quiescent Center of the Arabidopsis Root Apical Meristem. *Current Biology* **23**:1979-1989.